

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-191795

(43)Date of publication of application : 21.08.1991

(51)Int.Cl.

C12P 41/00
// (C12P 41/00
C12R 1:05)

(21)Application number : 01-330368

(71)Applicant : DAISO CO LTD

(22)Date of filing : 19.12.1989

(72)Inventor : SUZUKI TOSHIO
KASAI NAOYA

(54) PRODUCTION OF S-(+)-3-HALOGENO-1,2-PROPANEDIOL BY MICROORGANISMIC TREATMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To more economically obtain the subject S-(+)-3-halogeno-1,2- propanediol using a more ready technology than in the conventional method by utilizing a new strain separated from the soil, culturing the strain in a culture medium containing a specified carbon source and carrying out the separation and purification from the supernatant of cultured material.

CONSTITUTION: A bacterium belonging to Alkaligenes genus, having fermentation ability of an R-(-)-3-halogeno-1,2-propanediol and capable of growing by using the R-(-)-3-halogeno-1,2-propanediol as single carbon source or the cultured bacterium thereof is cultured in a culture medium containing a racemic 3-halogeno-1,2-propanediol as single carbon source and remaining S-(+)-3- halogeno-1,2-propanediol is separated from the cultured material. As the 3- halogeno-1,2-propanediol used in the above-mentioned method, 3-chloro-1,2-propanediol or 3-bromo-1,2-propanediol is suitable.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A) 平3-191795

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)8月21日

C 12 P 41/00
 //(C 12 P 41/00
 C 12 R 1:05)

C 7823-4B

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全11頁)

⑭ 発明の名称 微生物処理による S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールの製法

⑯ 特 願 平1-330368

⑰ 出 願 平1(1989)12月19日

⑱ 発 明 者 鈴木 利 雄 大阪府豊中市豊南町南3丁目9-12

⑲ 発 明 者 笠 井 尚 哉 兵庫県尼崎市大島2丁目35-1

⑳ 出 願 人 ダイソー株式会社 大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号

㉑ 代 理 人 弁理士 門 多 透

明 細 書

1. 発明の名称

微生物処理による S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールの製法

2. 特許請求の範囲

(1) R-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオール質化能を有し R-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールを単一炭素源として生育増殖しうるアルカリゲネス属に属する細菌又はその培養菌体をラセミ体 3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールを単一炭素源とする培地中で培養せしめ、残存する S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールを分取することを特徴とする微生物処理による S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールの製法。

(2) 請求項1に記載の 3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールが 3-クロロ-1, 2-プロバンジオールである製法。

(3) 請求項1に記載の 3-ハロゲノ-1, 2-

プロバンジオールが 3-プロモ-1, 2-プロバンジオールである製法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は微生物により、ラセミ体 3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールより光学活性な S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールを分取する方法に関するものである。

S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールは光学活性な医薬品や生理活性物質の合成原料として有用な物質である。例えば S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールは動物精子のグリコリスを阻害する活性をもつため抗生殖能作用を持つことが知られている。また S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバンジオールからは光学活性な医薬品あるいは生理活性物質、強誘電性液晶に有用な合成中間体 S-(+)-グリシドールに導くことができる。

(従来の技術)

S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロバン

ジオールの製法に関しては次のようなものが知られている。このうちHayan F. Jonesによるメチル-6-クロロ-6-デオキシ- α -D-グルコピラノシドより得る方法 (Chemistry and Industry, 15 P 533, 1978, 西独特許第2743858号) やPorter K.E. らによる1, 2, 5, 6-ジアセトン-D-マンニトールより得る方法 (Chem. Biol. Interaction 41, P 95, 1982) が知られている。しかしこれらの方法は化学合成法であるためいずれも原料の入手が困難であり、高度な合成手法を必要とし工程が複雑であるため工業的には不適当である。また本発明と同じく微生物を利用する方法としては高橋氏らの製法 (特開昭62-122596号, 昭63-36798号) が既に知られているが、これらの方法はR-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールが酸化的に分解、代謝される反応を利用した方法であり、以下のような問題点を有する。すなわち用いる微生物群、例えば例示されているトリスコスボロン・ファーメンタ

ス (Trichosporon fermentans) CBS 2264, ピキア・ファリノーサ (Pichia farinosa) IFO 1003, コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム (Corynebacterium asetoacidophilum) ATCC 21476, プロテウス・モルガニイ (Proteus morganii) IFO 3168はR-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを代謝しうるが、ラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とし稔安あるいは稔安のような無機体窒素を窒素源とする完全合成培地中では生育増殖できない。よってその反応に際しては実施例にみられるように、多量の菌体を栄養培地中で別に増殖させてその洗浄菌体をラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールに作用させねばならない。又は他の栄養源を含み生育できる培地中にラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを加えなければならない。これらの事はその反応あるいはその精製という観点からみると好ましくないと考えられる。
(発明が解決しようとする課題)

本発明は上記の従来法より経済的に安価でかつ技術的に簡便な方法によりS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを製造することを目的とする。

(課題を解決するための手段)

本発明者らはラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールからR-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを優先的に分解酸化し、さらに単一炭素源として生育増殖しうる微生物を求めべく検討を行い鋭意研究した結果、目的とする微生物の分離に成功し、S-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの製法を確立した。

すなわち本発明は、R-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール還元能を有し、R-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源として生育増殖しうるアルカリゲネス属に属する細菌又はその培養菌体を、ラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地中で培養せしめ、残存するS

-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを分取することを特徴とする微生物処理によるS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの製法である。

本発明者らが土壌より分離採取し、本発明に用いた微生物の形態学的、生理学的諸性質は表1に示すとおりである。

(以下余白)

表 1

A. 形態

2. 肉汁寒天斜面培地 (30℃, 3日間培養)			
	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
1) 生育の良否	良好	同左	同左
2) 生育状態	糸状	同左	同左
3) コロニーの表面	平滑	同左	同左
4) コロニー断面の形状	偏平状	同左	同左
5) コロニーの光沢	鈍光	同左	同左
6) コロニーの色調	乳白色	同左	同左
7) コロニーの透明度	半透明	同左	同左

B. 各培地における生育状態			
	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
1. 細胞の形	かん圓	同左	同左
2. 細胞の大きさ	0.4-0.6×1.2-1.5 μm	同左	同左
3. 細胞の多形性	無	同左	同左
4. 運動性の有無	有, 周鞭毛	同左	同左
5. 胞子の有無	無	同左	同左
6. グラム染色性	陰性	同左	同左
7. 抗酸性	無	同左	同左

3. 肉汁液体静置培養 (30℃, 3日間培養)

	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
1) 生育状態	少濁	同左	同左
2) ガスの発生	無	同左	同左
3) 培地の着色	無	同左	同左
4. ゼラチン液化テスト (+ : ゼラチンを液化する, - : ゼラチンを液化しない)	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
	-	-	-
5. リトマスミルク (+ : リトマスを白色に還元・凝固せず, - : 無変化, 凝固せず)	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
	-	-	-

B. 各培地における生育状態

	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
1. 肉汁寒天培地 (30℃, 3日間培養)	Alcaligenes DS-S-7G	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
	普通	同左	同左
1) コロニー形状の遅速	円形	同左	同左
2) コロニーの形状	平滑	同左	同左
3) コロニー表面の形状	凸状	同左	同左
4) コロニーの隆起状態	全円	同左	同左
5) コロニーの周辺	均質	同左	同左
6) コロニーの内容	乳白色	同左	同左
7) コロニーの色調	鈍光	同左	同左
8) コロニーの光沢	半透明	同左	同左
9) コロニーの透明度	無	同左	同左
10) 可溶性色素の生成			

C. 生理学的試験

	Alcaligenes DS-S-7C	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
3) D-ガラクトース	-	-	-
4) D-フラクトース	-	-	-
5) D-トレハロース	-	-	-
18. PHBの蓄積	+	+	+
19. 炭素源の利用			
1) D-マンニトール	-	-	-
2) D-フラクトース	-	-	-
3) D-グルコース	-	-	-
4) D-グルコン酸	+	+	+
5) D-ガラクトース	-	-	-
6) グリセリン	+	+	+
7) D-エーハイドロキシン安島香酸	-	-	-

	Alcaligenes DS-S-7C	Alcaligenes DS-S-8S	Alcaligenes DS-S-1C
12. 色素の生成	-	-	-
1) キングA培地	-	-	-
2) キングB培地	-	-	-
3) Pseudomonas P 培地	-	-	-
4) Pseudomonas F 培地	-	-	-
13. カタラーゼ	+	+	+
14. オキシダーゼ	+	+	+
15. アルギニンデヒドロゲナーゼ	-	-	-
16. ウレアーゼテスト	-	-	-
17. OF-テスト (Hugh Lelison法による。なお、ガスの生成は認められなかった。)	-	-	-
1) D-グルコース	-	-	-
2) グリセリン	0	0	0

以上の結果をもとにバージェイズ・マニュアル・オブ・システマテック・バクテリオロジー第9版に従い分類すると、グラム陰性、好気性細菌、周鞭毛を有し、オキシダーゼ陽性、カタラーゼ陽性からアルカリゲネス属に属することが判明した。近縁菌株としてはアルカリゲネス・フェーカリス (Alcaligenes faecalis)、アルカリゲネス・デニトリフィカンス サブスピーシーズ デニトリフィカンス (Alcaligenes denitrificans subsp. denitrificans)、アルカリゲネス・デニトリフィカンス サブスピーシーズ キシロスオキシダンス (Alcaligenes denitrificans subsp. xylosoxydans) が考えられるが、本菌株は炭素源としてD-グルコン酸及びグリセリンを利用できるのに対してアルカリゲネス・フェーカリスは炭素源としてグルコン酸及びグリセリンを利用できない点、また本菌株は炭素源としてD-グルコースを利用できないのに対してアルカリゲネス・デニトリフィカンス サブスピーシーズ キシロスオキシダンスは炭素源としてD-グルコースを利用できる

点、また本菌株は硝酸塩を還元できないのに対して、アルカリゲネス・デニトリフィカンス サブピーシーズ デニトリフィカンスは硝酸塩を還元することができる点が異なり、公知の菌株の特徴と一致するものがなく新菌株と考えられ、*Alcaligenes* sp. DS-S-7G, *Alcaligenes* sp. DS-S-8S, *Alcaligenes* sp. DS-S-1C と命名した。なお、これらの菌株は工業技術院微生物工業研究所において微工研菌寄第11111号 (FERM P-11111), 微工研菌寄第11112号 (FERM P-11112), 微工研菌寄第11113号 (FERM P-11113) として寄託されている。

本発明ではラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを含む培地中で上記微生物のいずれかを培養し、R-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを質化せしめ、ラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの光学活性化を行うものである。具体的にはラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素

源とし、無機態窒素 (各種アンモニウム塩又は硝酸塩) を窒素源として、その無機塩類を加えた合成培地中で上記細菌を培養するか、又は上記いずれか1種類の細菌をブイヨン培地あるいはペプトン培地等炭素源、窒素源、有機栄養源、無機栄養源を含む通常よく用いられる培地中で培養し、これらから得られる培養物あるいは培養菌体をラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源として含有する培地中に接種し、さらに培養あるいは作用させ、残存するS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを分取すればよい。炭素源としてはラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール、グリセリン等のアルコール類、クエン酸、マレイン酸、リンゴ酸、フマル酸等の有機酸及びその塩類を、窒素源としては硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機態窒素及び尿素、ペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、コーンブリーカー等の有機態窒素源を用いることができる。その他無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム

塩、カリ塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩等が用いられる。

本菌の培養は慣用の方法で行うことができる。通常、培養温度20-40℃、好ましくは25-37℃、pH約4-9好ましくはpH4.5-8.5で振盪培養あるいは通気攪拌培養等の手段により好氣的に行われる。反応液中の基質濃度は0.1-1.0% (v/v) 程度が好ましく、その反応時間は基質濃度、その他の反応条件によって異なるが48-80時間で終了するのが好ましい。反応の停止は残存する基質をガスクロマトグラフィー等で分析し、残存基質が約50%、すなわちR-(-)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールがすべて質化された時点で止めるのが好ましい。残存するS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの精製は次のように行う。すなわち培養終了後、培養液を取り出し遠心分離操作あるいは凝集剤等により微生物菌体とその上清液とに分離し、上清液中に残存するS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを活性炭に

吸着させ、アセトンで溶出し減圧蒸留するか、酢酸エチル等の溶媒抽出を行い減圧蒸留するののかのいずれかの方法で精製分取すればよい。

(実施例)

以下実施例により本発明を具体的に説明する。なお例中%は特に記載のない限り重量%を示す。

実施例1

硫酸	0.5%
リン酸第2ナトリウム	0.1%
リン酸第2カリウム	0.1%
リン酸第1ナトリウム	0.2%
硫酸マグネシウム	0.05%
硫酸鉄、硫酸銅、硫酸マンガン	微量
炭酸カルシウム	0.45%

pH 6.8

からなる組成の培地100mlを入れた坂口フラスコ(500ml)を121℃、15分間滅菌後、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを1.0% (v/v) になるように上記培地に添加し、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオ

ールを単一炭素源とする培地を作製した。次に表1に示した微生物Alcaligenes sp. DS-S-7Gを傾斜寒天培地から1白金耳上記培地に接種し、30℃、130rpmの条件で4日間振盪培養した。

培養終了後、培養液を取り出し遠心分離操作により固体を除去し、上清液を得た。この上清液を約20mlにまで濃縮し、酢酸エチルにより抽出、そして硫酸マグネシウムにより脱水後、減圧下で油状物質として3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを0.4g分取した。

本物質の同定はガスクロマトグラフィーによって行った。カラム担体PEG-20MP, 60-80メッシュを用いて市販のラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオール(東京化成社製品)と比較したところ保持時間は全く同じであった。

本物質の比旋光度及び(S)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの比旋光度(文献値)は次の如くである。

$$\text{本物質 } [\alpha]_D^{25} = 7.99 \quad (C=1, H_2O)$$

$$\text{文献値 } [\alpha]_D^{25} = 7.3 \quad (C=1, H_2O)$$

また、本物質を常法によりトシル化した後、光学異性体分離カラム(CHIRALCEL OCカラム(25cm×0.46cm I. D.))(ダイセル化学工業製)によりヘキサソートイソプロパノール(95:5)の溶媒を用いて室温、流速1.0ml/min、波長235nmの条件でHPLC分析を行った。この分析法で保持時間はS体7.9分、R体8.8分となり、本物質はS体に相当する保持時間を示し、光学純度98% e. e. 以上であった。

実施例2, 3

菌株を表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-8S及びAlcaligenes sp. DS-S-1Cに変更した以外は実施例1と同様の方法で行った。また得られた物質を実施例1に示した様に種々分析を行った結果、それぞれ光学純度98% e. e. 以上のS-(+)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。以下に実施例2, 3の結果をまとめて示す。

実施例	菌株	$[\alpha]_D^{25}$ (C=1, H ₂ O)	収量(g)
-----	----	--	-------

2	DS-S-8S	7.90°	0.42
---	---------	-------	------

3	DS-S-1C	7.97°	0.44
---	---------	-------	------

実施例4

硫酸	0.5%
リン酸第2ナトリウム	0.02%
リン酸第2カリウム	0.02%
リン酸第1ナトリウム	0.04%
硫酸マグネシウム	0.05%
硫酸鉄, 硫酸銅, 硫酸マンガン	微量

pH 6.8

からなる組成の培地2.5mlを入れた5ml容培養器(ジャーファーメンター)を121℃、15分間滅菌後、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを1.0%(v/v)になるように上記培地に添加し、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地を作製した。次に表1に示した微生物Alcaligenes sp. ds-s-7Gを予めペプトン1.0%、酵母エキス1.0%、グリ

セロール1.0%、pH7.2からなる栄養培地で30℃、24時間振盪培養し、上記ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地に2%(v/v)量無菌的に接種した。そして以下の条件で4日間通気攪拌培養を行った。

温度	30℃
通気量	0.5 l/min
回転数	500 rpm

なおpHの測定及び制御は連動させたpHメーターで行い3N-NaOHによりpH6.8に制御した。

培養終了後、培養液を取り出し遠心分離操作により固体を除去し、上清液を得た。上清液からの3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの調製は実施例1と同様にして行い、15.2gを分取した。この得られた物質を実施例1に示した様に種々分析を行った結果、光学純度98% e. e. 以上のS-(+)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。本物質の比旋光度は $[\alpha]_D^{25} =$

7.95° (C=1, H₂O)であった。

実施例5, 6

菌株を表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-8S及びAlcaligenes sp. DS-S-1Cに変更した以外は実施例4と同様の方法で行った。また、得られた物質を実施例1に示した様に種々分析を行った結果、それぞれ光学純度98% e. e. 以上のS-(+)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。以下に実施例5, 6の結果をまとめて示す。

実施例	菌株	$(\alpha)_D^{25}$ (C=1, H ₂ O)	収量 (g)
5	DS-S-8S	7.87°	14.6
6	DS-S-1C	7.89°	15.3

実施例7

ペプトン1.0%, 酵母エキス1.0%, グリセロール1.0%, pH7.2からなる組成の栄養培地100mLを入れた坂口フラスコ(500mL容)を121℃, 15分間滅菌後、表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-7Gを傾斜寒天培地から1白金

耳接種した。30℃, 24時間振盪培養した後、遠心分離操作により菌体と上清液とを分離し、上清液を廃棄した。得られた菌体を50mMリン酸緩衝液, pH7.0にて2-3回洗浄し、洗浄菌体とした。次に実施例1に示したラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地100mLに懸濁し、30℃, 130rpmで3日間反応させた。反応終了後、遠心分離操作により菌体を除去し、上清液を得た。上清液からの3-クロロ-1, 2-プロパンジオールの調製は実施例1と同様にして行い0.4gを分取した。得られた物質を実施例1に示した様に種々分析を行った結果、光学純度98% e. e. 以上のS-(+)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。本物質の比旋光度は $(\alpha)_D^{25} = 7.98^\circ$ (C=1, H₂O)であった。

実施例8, 9

菌株は表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-1Cに変更した以外は実施例7と同様の方法で行った。

また得られた物質を実施例1に示した様に種々分析を行った結果、それぞれ光学純度98% e. e. 以上のS-(+)-3-クロロ-1, 2-プロパンジオールであった。以下に実施例8, 9の結果をまとめて示す。

実施例	菌株	$(\alpha)_D^{25}$ (C=1, H ₂ O)	収量 (g)
8	DS-S-8S	7.99°	0.42
9	DS-S-1C	7.94°	0.38

実施例10~12

実施例1~3に従いラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールをラセミ体3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールに替えて実験を行った。実験方法及びその他の操作は実施例1に従って行った。実施例10~12で得られた物質の比旋光度及び収量をまとめたものを以下に示す。

実施例	菌株	$(\alpha)_D^{25}$ (C=1, CHCl ₃)	収量 (g)
10	DS-S-7G	3.82°	0.62
11	DS-S-8S	3.78°	0.56

12 DS-S-1C 3.83° 0.66

また、実施例10~12で得られた物質を常法によりトシル化した後、光学異性体分離カラム(CHIRALCEL OCカラム(25cm×0.46cm I. D.)) (ダイセル化学工業製)によりヘキサン-イソプロパノール(95:5)の溶媒を用いて室温、流速1.0mL/min、波長235nmの条件でHPLC分析を行った。この分析法では保持時間はS体98.9分、R体115.4分となり、本物質はS体に相当する保持時間を示し、それぞれ光学純度96% e. e. 以上であった。

実施例13~15

実施例4~6に従いラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを3-ブロモ-1, 2-プロパンジオールに替えて実験を行った。実験方法及びその他の操作は実施例4に従って行った。実施例13~15で得られた物質を実施例10に示した様に種々分析を行った結果、それぞれ光学純度96% e. e. 以上のS-(+)-3-ブロモ

1. 2-プロパンジオールであった。以下に実施例13～15の結果をまとめて示す。

実施例	菌株	$(\alpha)_D^{25}$ (C=1, CHCl ₃)	収量 (g)
13	DS-S-7G	3.80°	15.4
14	DS-S-8S	3.77°	16.3
15	DS-S-1C	3.81°	16.2

実施例16～18

実施例7～9に従いラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールをラセミ体3-ブromo-1, 2-プロパンジオールに替えて実験を行った。実験方法及びその他の操作は実施例7に従って行った。実施例16～18で得られた物質を実施例10に示した様に種々分析を行った結果、それぞれ光学純度96% e. e. 以上のS-(+)-3-ブromo-1, 2-プロパンジオールであった。以下に実施例16～18の結果をまとめて示す。

実施例	菌株	$(\alpha)_D^{25}$ (C=1, CHCl ₃)	収量 (g)
-----	----	--	--------

16	DS-S-7G	3.80°	0.55
17	DS-S-8S	3.79°	0.61
18	DS-S-1C	3.84°	0.53

(発明の効果)

本発明によれば土壤中より分離した新菌株を利用してラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールからR-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを優先的に変化させることにより原料的に安価で、かつ工業的に簡便な方法によってS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを製造することができる。

特許出願人 ダイソー株式会社
代理人 弁理士 門多 透

手続補正書(自発)

平成 2年 9月 4日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示 平成1年特許願第330368号
2. 発明の名称 微生物処理によるS-(+)-3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールの製法

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
〒550 大阪市西区江戸堀 1丁目10番 8号
ダイソー株式会社
代表者 中 澤 晴

4. 代理人
〒550 大阪市西区江戸堀 1丁目10番 8号
ダイソー株式会社内
弁理士(7665)門多 透
TEL (06) 443-5995

5. 補正の対象 明細書の「特許請求の範囲」、
「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

(1) 明細書の特許請求の範囲を別紙のように補正する。

(2) 明細書の発明の詳細な説明中の下記の個所を次のように訂正する。

頁	行	訂 正 前	訂 正 後
2	5	微生物により、	微生物を用いて、
2	下より5	医農薬	医薬、農薬
3	2	このうち	このうち化学合成法としては
3	10	であるため	であるため、
3	下より7	-122596号、	-122596号公報、
3	下より6	昭63- 36798号	特開昭63- 36798号公報
3	下より1	トリスコスボロン	トリコスボロン
4	9	炭素源とし	炭素源とし、
5	6	本発明者らは	本発明者らは、
5	10～11	目的とする	土壌より目的とする
5	下より1	残存する	培養物より、残存する
8	下より10	1) コロニー形状	1) コロニー形成
14	3	グラム陰性、	上記菌株は、グラム陰性

方式 審査 市川



頁	行	訂 正 前	訂 正 後
14	4~5	カタラーゼ陽性か ら	カタラーゼ陽性である ことから、
14	下より8	本菌株	上記菌株
14	下より4	本菌株	上記菌株
15	1	本菌株	上記菌株
15	4	公知の菌株	上記菌株は、公知の菌株
15	8	工業研究所	工業技術研究所
16	2	その無機塩類	その他無機塩類
16	10	残存する	培養物より、残存する
16	下より2~3	コンプリカー	コンスチープリカー
17	3	本菌	上記菌
17	9	異なるが	異なるが、
17	下より5	精製	採取、精製
18	2	蒸留するのかの	蒸留するかの
19	下より2	7.99	7.99°
20	1	7.3	7.3°
21	下より2	ds-s-	DS-S-
22	2	上記ラセミ体	これを上記ラセミ体
24	5	実施例1に	この菌体を実施例1に

(3) 明細書第6頁第4行の「製法である。」の次に行を改め次文を挿入する。

「本発明によれば、S-(+)-3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールの大規模生産を行う場合にも多量の菌体を別途に培養し集菌しなくても種菌としての分量だけを培養し、それを接種すればよい。

本発明で用いることのできる微生物はいずれも R-(-)-3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールを利用するにあたり、R-(-)-3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールの脱ハロゲン化水素反応を行い、ハロゲン化水素酸を生ずる。また本発明に用いられる 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールとしては 3-クロロー 1,2-プロパンジオールもしくは 3-ブromo 1,2-プロパンジオールが適当である。」

(4) 明細書第7頁第3~第4行、第8頁第3~第4行、第9頁第2~第3行、第10頁第2~第3行、第10頁第8~第9行、第10頁下より第3~第2行、第11頁第2~第3行、第12頁第1

~第2行、第13頁第1~第2行の「Alcaligenes DS-S-7G Alcaligenes DS-S-8S Alcaligenes DS-S-1C」をそれぞれ「Alcaligenes sp. DS-S-7G Alcaligenes sp. DS-S-8S Alcaligenes sp. DS-S-1C」と訂正する。

(5) 明細書第10頁最下行の次に行を改め次文を挿入する。

「6. MGPB寒天培地(30℃, 6日間)

(MGPB寒天培地: 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオール 1.0%, ペプトン 0.1%, 酵母エキス 0.1%, プロモ・チモール・ブルー 0.01%, 寒天 2.0%, pH 7.0)

	Alcaligenes sp. DS-S-7G	Alcaligenes sp. DS-S-8S	Alcaligenes sp. DS-S-1C
1) コロニー形状の遅速	遅い	同左	同左
2) コロニーの形状	円形	同左	同左
3) コロニー表面の形状	平滑	平滑	しわ状(同心円状)
4) コロニーの隆起状態	凸状	凸状	扁平状
5) コロニーの周辺	全縁	全縁	波状
6) コロニーの内容	均質	同左	同左
7) コロニーの色調	中心部褐色 周辺部乳白色	褐色	褐色
8) コロニーの光沢	鈍光	同左	同左
9) コロニーの透明度	不透明	同左	同左
10) 可溶性色素の生成	無	同左	同左

(6) 明細書第14頁第8行の「ニトリフィカンス サブピーシーズ デニトリ」を「ニトリフィカンス・サブピーシーズ・デニトリ」と訂正する。

(7) 明細書第14頁第11行の「イカンス サブピーシーズ キシロスオキシタン」を「イカンス・サブピーシーズ・キシロスオキシタン」と訂正する。

(8) 明細書第15頁第2行～第3行の「デニトリフィカンス サブピーシーズ デニトリフィカンス」を「デニトリフィカンス・サブピーシーズ・デニトリフィカンス」と訂正する。

(9) 明細書第15頁第7行の「命名した。」の次に次文を挿入する。

「また上記菌株はそれぞれアルカリゲネス属に属する類似菌株であるが、MGPB寒天培地の生育状態においてAlcaligenes sp. DS-S-7GとAlcaligenes sp. DS-S-8Sはコロニー表面の形状が平滑であるのに対してAlcaligenes sp. DS-S-1Cはコロニー表面の形状がしわ状（同心円状）である点、Alcaligenes sp. DS-S-8Sはコロニーの色調が橙色である点が異なり、上記菌株はそれぞれ3種の異なる菌株として同定した。」

(10) 明細書第15頁第13行の「寄託されている。」の次に行を改め次文を挿入する。

「なお、本発明における使用菌としては、上記菌株ばかりでなく、R-(-) - 3-ハロゲノー

1,2-プロパンジオール質化能を有し、R-(-) - 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールを単一炭素源として生育増殖しうるアルカリゲネス属に属する細菌であれば、すべて用いることができる。」

(11) 明細書第24頁下より第2行「菌株は表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-1C」を「菌株を表1に示したAlcaligenes sp. DS-S-8S及びAlcaligenes sp. DS-S-1C」と訂正する。

(12) 明細書第28頁第5行の「本発明によれば土壌中より分離した新菌株」を「アルカリゲネス属の細菌」と訂正する。

2. 特許請求の範囲

(1) R-(-) - 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオール質化能を有し、R-(-) - 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールを単一炭素源として生育増殖しうるアルカリゲネス属に属する細菌又はその培養菌体を、ラセミ体 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールを単一炭素源とする培地中で培養せしめ、培養物より、残存するS-(+) - 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールを分取することを特徴とする微生物処理によるS-(+) - 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールの製法。

(2) 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールが 3-クロロ 1,2-プロパンジオールである請求項1に記載の製法。

(3) 3-ハロゲノー 1,2-プロパンジオールが 3-プロモ 1,2-プロパンジオールである請求項1に記載の製法。

手続補正書(自発)

平成 3年 1月10日

特許庁長官

植松 敏 殿

通

1. 事件の表示 平成1年特許願第330368号
2. 発明の名称 微生物処理によるS-(+) - 3-ハロゲノー 1, 2-プロパンジオールの製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

〒550 大阪市西区江戸堀 1丁目10番 8号
ダイソー株式会社
代表者 中澤 晴

4. 代理人

〒550 大阪市西区江戸堀 1丁目10番 8号
ダイソー株式会社内
弁理士(7665)門多 透
TEL (06) 443-5995

5. 補正の対象

明細書の「発明の詳細な説明」の欄

方式(市)

特許庁
3. 1. 14

6. 補正の内容

(1) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄(平成2年9月4日提出の手続補正書第7頁下より第8行)

の「(同心円状)である点。」の次に「また、
Alcaligenes sp. DS-S-7Gはコロニーの色調が中心部橙色・周辺部乳白色であるのに対して」を挿入する。上記欄(上記手続補正書第7頁下より第5行)の「として同定した。」を「であることが判明した。」と訂正する。